



UNIwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 24/28
Tel. + 48 12 662-40-96
E-mail: km@urk.edu.pl

Kraków, dnia 14 kwietnia 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: mgr Artur Nowak

Tytuł pracy:

„Charakterystyka zewnątrzkomórkowych polimerów uzyskanych z hodowli wybranych grzybów Ascomycota”

Praca wykonana w Instytucie Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Jolanty Jaroszuk-Ściseł prof. UMCS Lublin.

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Pani prof. dr hab. Anny Jarosz -Wilkołazka z dnia 23.03.2021 roku, w którym poinformowano mnie, że decyzją Rady Naukowej zostałam powołana na recenzentkę ww. pracy.

Problematyka badawcza

Polimery od lat wykorzystywane są w wielu gałęziach przemysłu, jednak - wobec zagrożenia jakie syntetyczne związki mogą stanowić dla środowiska - naukowcy wciąż poszukują naturalnych substancji, które, przynajmniej częściowo, mogłyby je zastąpić. Doskonałą alternatywę dla niektórych syntetyków stanowią biopolimery, których przykładem mogą być polisacharydy uzyskiwane z roślin (skrobia i pektyny) oraz wodorostów (agar i alginian), znajdujące zastosowanie w przemyśle spożywczym i kosmetycznym jako substancje stabilizujące i konserwujące, czy wykorzystywane w medycynie naturalnej, a także rolnictwie jako stymulanty odporności roślin. Jednak produkcja związków pochodzenia

roślinnego wymaga czasu i przestrzeni, toteż - od około 30 lat - naukowcy kierują swoją uwagę na związki, których produkcja mogłaby odbywać się przy udziale drobnoustrojów. Wiele mikroorganizmów, oprócz wytwarzania enzymów, witamin, pigmentów, antybiotyków czy toksyn, posiada także zdolność do syntezy zewnątrzkomórkowych substancji polimerycznych - EPS. Głównym składnikiem EPS są polisacharydy (40% do 95%), pozostałą zaś część stanowią białka, związki fenolowe, pochodne kwasu uronowego, lipidy i pochodne związków aminowych. Ze względu na dominujący składnik cukrowy przez wiele lat skrótem EPS określano egzopolisacharydy - długołańcuchowe polimery węglowe wydzielane do środowiska zewnętrznego przez mikroorganizmy. Zdolność do syntezy EPS wykazują zarówno Protista, jak i bakterie oraz grzyby - związki te dają im przewagę w środowisku, pozwalając na zwiększenie adaptacji do niekorzystnych warunków wzrostu, takich jak: zmiany temperatury czy wahania wartości pH, okresowa susza, obecność środków powierzchniowo czynnych czy antybiotyków. Mikrobiologiczne egzopolisacharydy są z natury substancjami biodegradowalnymi, przez co mniej szkodliwymi dla środowiska niż polimery syntetyczne.

Dotychczas uzyskano wiele EPS – głównie pochodzenia bakteryjnego, które znalazły zastosowanie komercyjne w produkcji kosmetyków oraz żywności, w farmacji, badaniach medycznych i analityce. Można wymienić tutaj substancje takie, jak: ksantyn czy kurdlan wykorzystywane w przemyśle spożywczym, dekstran znajdujący zastosowanie w kosmetologii, lewan w medycynie, bakteryjna celuloza, z której wykonuje się nowoczesne opatrunki czy β -glukany znajdujące zastosowanie w leczeniu zmian nowotworowych jako biostymulanty układu odpornościowego i wiele innych.

Bardzo interesująca wydaje się także możliwość wykorzystania egzopolimerów grzybów, które stanowią jedną z najważniejszych i najbardziej zróżnicowanych grup organizmów zasiedlających środowisko naturalne i wiele z nich wykazuje zdolność do syntezy szerokiego spektrum bioaktywnych metabolitów wtórnych - od niskocząsteczkowych substancji sygnałowych, przez rozbudowane strukturalnie toksyny do zewnątrzkomórkowych substancji polimerycznych. Niektóre z tych produktów jak pullulan wytwarzany przez *Aureobasidium pullulans* są już powszechnie wykorzystywane, inne czekają na odkrycie.

Przedstawiona do recenzji praca, przygotowana przez mgr. Artura Nowaka, dotyczy istotnego problemu badawczego związanego z możliwością uzyskania polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS) z hodowli wybranych izolatów grzybów typu Ascomycota, a podjęty temat badawczy stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy z zakresu mykologii.

W literaturze można znaleźć liczne prace zawierające wyniki badań dotyczących EPS produkowanych przez bakterie, jednak piśmiennictwo związane z wytwarzaniem substancji polimerycznych przez grzyby jest dość skąpe. Warto w tym miejscu również wspomnieć, że Doktorant jest współautorem jednej z nielicznych prac dotyczących tego zagadnienia, która ukazała się w czasopiśmie „Molecules” zaledwie rok temu („Differences in production, composition and antioxidant activities of exopolymeric substances (EPS) obtained from cultures of endophytic *Fusarium culmorum* strains with different effects on cereals” doi:10.3390/molecules25030616) i do której kilkakrotnie odwołuje się w niniejszym opracowaniu.

Praca doktorska mgr. Artura Nowaka wpisuje się w problematykę badań związanych z poszukiwaniem nowych biopolimerów oraz optymalizacją warunków ich wytwarzania, a przedstawione w niej wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania metody ich produkcji na skalę przemysłową.

Podjęta w rozprawie tematyka jest aktualna i doskonale wpisuje się w bieżące potrzeby wielu dziedzin - nie tylko nauki, ale także rolnictwa, ochrony środowiska i, nie wykluczone, że w przyszłości również przemysłu.

Mając na uwadze różnorodność oraz szeroki zakres badań wykonanych w ramach przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej pozytywnie oceniam opracowanie, które jest nowatorskie i moim zdaniem wchodzi zarówno w zakres dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych jak i rolniczych, uważam że mieści się w dyscyplinach: nauki biologiczne oraz rolnictwo i ogrodnictwo.

Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w formie zwięzłego opracowania w sposób typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych i obejmuje 298 stron maszynopisu - w tym: 253 strony zasadniczego tekstu (z uwzględnieniem stron tytułowych, spisu treści, wykazu używanych skrótów oraz streszczeń w języku polskim i angielskim), 16 stron spisu bibliografii, 1 strona spisu wykorzystanych źródeł internetowych, 1 strona zawierająca spis tabel, 7 stron spisu rycin, 14 stron suplementu w postaci rycin i tabel, które nie zostały zamieszczone w tekście zasadniczym oraz 6 stron życiorysu naukowego w postaci aneksu, w którym uwzględniono publikacje Doktoranta, udział w grantach, wystąpienia konferencyjne, nagrody i wyróżnienia, patenty i inne informacje dotyczące jego działalności naukowej.

Opracowanie podzielono na dwanaście rozdziałów z licznymi podrozdziałami systematyzującymi informacje literaturowe, cel i hipotezę badawczą, dane na temat zastosowanych materiałów i metod badawczych – w tym analizy statystycznej, opis wyników z badań własnych autora, dyskusję, podsumowanie i wnioski.

Pod względem układu, w mojej opinii, praca została przygotowana poprawnie, jest logiczna, a treści zostały przedstawione we właściwej kolejności. Pod względem formalnym opracowanie nie wzbudza zastrzeżeń, jest napisane w sposób poprawny językowo – błędy edytorskie są zdumiewająco nieliczne. Praca przygotowana jest ciekawie i spójnie, a zgromadzone pozycje literatury zostały zacytowane poprawnie.

Wykorzystana w przygotowaniu opracowania starannie dobrana bibliografia obejmuje 444 pozycje z czego 36 to strony internetowe (netografia). Zgromadzona literatura to głównie najnowsze publikacje w języku angielskim oraz pozycje starsze, które niezbędne były dla prawidłowego przedstawienia analizowanego zagadnienia, zarówno od strony teoretycznej jak i praktycznej.

Sposób zestawienia rezultatów badań i wykonana analiza świadczą o tym, że Doktorant potrafi dojrzałe i trafnie weryfikować informacje naukowe. W pracy znajdujemy aż 145 rycin i 22 tabele - głównie zawierające wyniki badań własnych. Przedstawienie większości wyników w formie graficznej - w postaci wykresów, było bardzo dobrym wyborem autora, gdyż pozwala to czytelnikowi na szybszą i łatwiejszą analizę rezultatów badań, co czasami bywa utrudnione w przypadku zestawień tabelarycznych. Część rycin, a także obszerne tabele w wynikami zamieszczono w suplemencie – pozwala to na szczegółowe zapoznanie się z danymi, które nie znalazły się w tekście głównym opracowania. Treść pracy uzupełnia również dokumentacja fotograficzna i kilka schematów.

W mojej ocenie rozdział 1.2.1, chociaż bardzo ciekawie i starannie opracowany, jest nieco zbyt obszerny; z kolei za bardzo celowe uznaję szczegółowe scharakteryzowanie rodzajów *Fusarium*, *Penicillium* oraz *Trichoderma* będących głównymi obiektami badań.

Praca została przygotowana wyjątkowo starannie – znalazłam jedynie nieliczne błędy głównie edytorskie, jak m.in.: str. 20 – „Gatunek *Fusarium*...”; str. 48 – jest zatrzymanie zamiast zatrzymanie; str. 61 – wiersz 6 – powinno być rodzajów a nie gatunków; str. 79 – jest „znaleźć można doniesień”; str. 146 – jest procest zamiast proces; str. 156 – brak kursywy przy nazwie łacińskiej.

Jedyna moja istotniejsza uwaga w tym miejscu dotyczy tytułów podrozdziałów 1.2.1.1, 1.2.1.2 i 1.2.1.3 odpowiednio: „Charakterystyka gatunku *Fusarium* spp.”, „Charakterystyka

gatunku *Trichoderma* spp.”, „Charakterystyka gatunku *Penicillium* spp.” – są nieco mylące gdyż spodziewać się można opisu np. nowego gatunku, któremu nie nadano jeszcze nazwy. W mojej ocenie lepiej treści rozdziałów odpowiadałoby: „Charakterystyka gatunków z rodzaju *Fusarium*” lub po prostu „Charakterystyka *Fusarium* spp.” itp.

Ocena pracy pod względem metodycznym

W ramach części eksperymentalnej przedstawionej do recenzji pracy Doktorant wykonał szereg analiz związanych z optymalizacją warunków hodowli wybranych 12 izolatów grzybów (3 szczepy *Fusarium culmorum*: Fc2-PGPF, Fc5-DRMO, Fc37-patogen, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. reesei*, *Penicillium simplicissimum*, *P. paneum*, *P. commune*) wpływających na wydajność wytwarzania EPS takich jak: dobór wyjściowego podłoża hodowlanego, czasu i temperatury inkubacji, wybór źródła węgla i azotu oraz ich stężeń w pożywce a także optymalizacja wyjściowej wartości pH. Ważnym etapem badań, czasochłonnym i wymagającym znajomości wielu technik badawczych, była analiza składu polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS) wytworzonych przez grzyby.

Autor jednak nie ograniczył się tylko do badań nad optymalizacją produkcji EPS grzybów i oznaczaniem ich składu, ale, co szczególnie wartościowe, ocenił ich wybrane właściwości biologiczne. W tym etapie wykonane zostały badania nad wpływem metali ciężkich na stężenie EPS produkowanych w warunkach *in vitro* oraz właściwości chelatujące biopolimerów, oceniono również ich właściwości antyoksydacyjne, wpływ na kiełkowanie nasion i rozwój siewek pszenicy a także, co - w mojej ocenie - najciekawsze z rolniczego punktu widzenia, indukcję oporności w tkankach pszenicy w oparciu o aktywność enzymów markerowych takich jak: liaza fenyloalaninowa, liaza tyrozynowa, peroksydaza askorbinianowa, peroksydaza gwajakolowa, katalaza, glukanaza i chitynaza.

Metodyka została poprawnie opisana i uzupełniona odsyłaczami do stosownych tekstów źródłowych. Doświadczenia były zaplanowane logicznie, a szeroko zakrojone badania laboratoryjne wymagały od Doktoranta dużego nakładu pracy, konsekwencji w działaniu, systematyczności i dokładności, bowiem tego typu analizy są bardzo czasochłonne i wymagają ogromnego zaangażowania badacza.

W moim mniemaniu Doktorant umiejętnie wykorzystał znajomość różnych technik badawczych, nie tylko typowo mikrobiologicznych, ale także analiz biochemicznych, co często stanowi wyzwanie nie tylko dla młodych badaczy.

Zgromadzone wyniki zostały poprawnie opracowane z wykorzystaniem podstawowych metod statystycznych.

W tym momencie nasuwają mi się dwa pytania dotyczące metodyki:

- Badano szczepy wyizolowane i opisane m.in. w latach 1994 i 2007 i napisano, że były przechowywane na podłożu Martina – od lat czy tylko w okresie badań?
- Skąd decyzja o badaniach składu EPS trzema metodami chromatograficznymi?

Jedyna moja uwaga/zastrzeżenie do metodyki dotyczy informacji zawartych w rozdziale 3.3. Inokulacja podłóż zawiesiną zarodników badanych szczepów (strona 83) - otóż jeśli liczebność zarodników grzybów oznaczano z wykorzystaniem hemocytometru to nie można podać gęstości zawiesiny w postaci JTK/mL – chyba, że oznaczano ją również z wykorzystaniem metody hodowlanej - ale takiej informacji w treści pracy nie podano.

Ocena merytoryczna pracy

Autor pracy postawił sobie ambitny cel nie tylko uzyskania polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS) z hodowli dwunastu szczepów grzybów należących rodzajów *Fusarium*, *Trichoderma* i *Penicillium*, ale także optymalizacji warunków ich inkubacji dla uzyskania maksymalnego stężenia EPS w hodowlach, poznania budowy i składu bipolimerów wytwarzanych przez szczepy reprezentujące różne gatunki, ale przede wszystkim określenie wybranych właściwości uzyskanych EPS, wśród których za najciekawsze uważam badanie ich właściwości elicytorowych – czyli indukowania w tkankach siewek pszenicy aktywności enzymów charakterystycznych dla szlaków odporności roślin.

Teoretyczne podstawy związane z celami badawczymi autor przedstawił w prawie siedemdziesięciu stronicowym wstępie, w którym scharakteryzował grzyby z typu Ascomycota ze szczególnym uwzględnieniem rodzajów stanowiących materiał badawczy i omówił zagadnienia dotyczące polimerów zewnątrzkomórkowych w tym ich zróżnicowanie strukturalne oraz główne szlaki syntezy i czynniki wpływające na regulację syntezy EPS przez mikroorganizmy. W tym rozdziale czytelnik znajdzie również przekrojowe informacje na temat bioaktywnych polimerów zewnątrzkomórkowych, ich komercyjnego zastosowania w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmacji oraz roli biopolimerów w środowisku i ich potencjalnego wykorzystania w rolnictwie.

Zamierzony cel badań Doktorant osiągnął przygotowując przemysłany eksperyment i przeprowadzając szeroko zakrojone badania laboratoryjne dotyczące optymalizacji warunków hodowli wybranych grzybów i analizy składu wytworzonych przez nie polimerów

zewnątrzkomórkowych oraz oceny wybranych właściwości biologicznych uzyskanych EPS. Wyniki zostały przedstawione głównie graficznie na licznych wykresach, co znacząco ułatwiło analizę i interpretację otrzymanych danych.

Szczególnie istotne w rozdziale Wyniki wydają się dane dotyczące indukowania odporności roślin - co może mieć niebagatelne znaczenie aplikacyjne dla rolnictwa.

Rezultaty analiz zostały poddane dyskusji w rozdziale piątym, w którym autor omówił uzyskane wyniki na tle literatury. W ramach tego rozdziału dokonana została szczegółowa analiza tekstów źródłowych związanych z tematyką realizowanych badań, co z pewnością stanowiło dla Doktoranta ogromne wyzwanie ze względu na niedostatek publikacji bezpośrednio korespondujących z jego eksperymentami. Rozdział Dyskusja stanowi bogate podsumowanie wiedzy merytorycznej dotyczącej podjętego w rozprawie problemu i świadczy o analitycznych zdolnościach Doktoranta oraz dużej wiedzy teoretycznej.

W końcowym rozdziale autor zamieścił krótkie podsumowanie otrzymanych wyników oraz wniosek końcowy wraz z siedemnastoma rzeczowymi wnioskami szczegółowymi, które stanowią bezpośrednie odbicie otrzymanych wyników badań, są konkretne i odnoszą się do celu pracy. Na zacytowanie zasługuje wniosek końcowy, w którym autor podsumowując swoje badania podaje, że hodowle Ascomycota są źródłem EPS o odmiennym składzie i cennych właściwościach biologicznych wytwarzanych z intensywnością zależną od warunków hodowli, a wytwarzanie EPS przez grzyby może być cechą szczepową, ale też zależną od przynależności do gatunku lub rodzaju. Godne uwagi są również szczegółowe wnioski 16 i 17 dotyczące wpływu uzyskanych EPS na rośliny w których zwrócono uwagę na 25% wzrost świeżej masy siewek pszenicy pod wpływem EPS uzyskanych z hodowli szczepów *F. culmorum* Fc37 i *T. koningiopsis* oraz na fakt, że egzopolimery wykazywały zdolność do stymulacji aktywności enzymów markerowych dla indukcji odporności roślin.

Mając na uwadze informacje zawarte w poszczególnych rozdziałach i podrozdziałach praca może stanowić istotną pozycję w literaturze dotyczącej nie tylko mykologii ale także biochemii i fizjologii roślin.

Przedstawione w pracy wyniki badań mają także znaczenie aplikacyjne dostarczając ważnych informacji o optymalizacji wytwarzania EPS, które ze względu na zdolność immobilizacji metali, właściwości antyoksydacyjne oraz elicytorowe mogą, po serii badań wdrożeniowych, znaleźć zastosowanie komercyjne w takich dziedzinach jak: medycyna, ochrona środowiska oraz rolnictwo - jako preparaty antyoksydacyjne, bioremediacyjne oraz biologiczne środki ochrony roślin.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa naukowa pt. „Charakterystyka zewnątrzkomórkowych polimerów uzyskanych z hodowli wybranych grzybów Ascomycota” przygotowana przez mgr. Artura Nowaka stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje, że autor posiada niezbędną wiedzę teoretyczną, zdolny jest do planowania eksperymentów, opanował techniki laboratoryjne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej w dyscyplinie nauki biologiczne spełniając tym samym wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim (akty prawne: Dz.U. 2016 poz. 882, Dz.U. 2016 poz. 1311, Dz.U. 2017 poz. 859).

W związku z powyższym wnioskuję do członków Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr. Artura Nowaka do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Jednocześnie, mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych badań, wartość uzyskanych wyników, wysoki poziom merytoryczny opracowania, nowatorstwo oraz potencjał aplikacyjny pracy, wnoszę o jej wyróżnienie.

Dr hab. inż. Maria J. Chmiel prof. UR


.....